



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ³ : C07H 19/20; G01N 53/50 C12Q 1/39	AI	(11) Numéro de publication internationale: WO 83/02276 (43) Date de publication internationale: 7 juillet 1983 (07.07.83)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR82/00222 (22) Date de dépôt international: 29 décembre 1982 (29.12.82) (31) Numéro de la demande prioritaire: 81/24442 (32) Date de priorité: 29 décembre 1981 (29.12.81) (33) Pays de priorité: FR	(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.: Cabinet Plasse- raud, 84, rue d'Amsterdam, F-75009 Paris (FR). (81) États désignés: BE (brevet européen), CH (brevet euro- péen), DE (brevet européen), GB (brevet européen), JP, US. Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): INSTI- TUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur Roux, F-75015 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : KOURILSKY, Philippe [FR/FR]; 207, rue de Vaugirard, F-75015 Pa- ris (FR). VINCENT, Christian [FR/FR]; 24, rue du Hameau, F-75015 Paris (FR). TCHEN, Paul [FR/FR]; 18, rue du Télégraphe, F-92000 Nanterre (FR).		

(54) Title: MODIFIED ADENOSINE 5'-TRIPHOSPHORIC ACID AND METHOD FOR DOSING BIOLOGICAL SUBSTANCES CAPABLE OF FIXING DEGRADATION PRODUCTS OF ADENOSINE 5'-TRIPHOSPHORIC ACID

(54) Titre: ACIDE ADENOSINE 5'-TRIPHOSPHORIQUE MODIFIÉ ET PROCÉDE DE DOSAGE DE SUBSTANCES BIOLOGIQUES SUSCEPTIBLES DE FIXER DES PRODUITS DE DEGRADATION DE L'ACIDE ADENOSINE 5'-TRIPHOSPHORIQUE

(57) Abstract

Modified ATP capable of originating an ADP or AMP, which is also modified, and may be incorporated in biological substances, and allowing the detection and optionally the dosing of the latter. Such modified ATP is characterized by the covalent fixation, on the adenine cycle of the ATP, of a chemical group which may be coupled directly or indirectly with a related molecule, preferably marked by an enzyme, thereby allowing the recognition of said ATP, ADP or AMP.

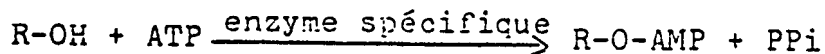
(57) Abrégé

Un ATP modifié susceptible de donner naissance à un ADP ou AMP également modifié, incorporable à des substances biologiques et permettant la détection et éventuellement le dosage de ces dernières. Cet ATP modifié est caractérisé par la fixation covalente, sur le cycle adénine de l'ATP, d'un groupe chimique couplable directement ou indirectement avec une molécule affine, de préférence marquée par une enzyme, permettant la reconnaissance de cet ATP, ADP ou AMP.

Acide adénosine 5'-triphosphorique modifié et procédé de dosage de substances biologiques susceptibles de fixer des produits de dégradation de l'acide adénosine 5'-triphosphorique.

L'invention est relative à un dérivé de l'acide adénosine 5'-triphosphorique (en d'autres termes à un dérivé de l'ATP) et à un procédé de dosage de substances biologiques susceptibles, en présence de l'enzyme appropriée, d'incorporer un produit de dégradation de l'ATP, en d'autres termes l'acide adénosine 5'-monophosphate (AMP) ou de l'acide adénosine 5'-diphosphate (ADP).

Il est connu qu'une catégorie de substances biologiques, notamment certains antibiotiques, plus particulièrement ceux de la classe des aminoglycosides, sont capables, en présence d'enzymes spécifiques, d'incorporer de l'ADP ou de l'AMP, ces dernières molécules étant susceptibles d'être fournies à cet antibiotique à partir de l'ATP. Cette incorporation est schématisée par l'équation de réaction suivante, dans laquelle R-OH représente l'antibiotique :



Les abréviations PPi (pyrophosphate) et Pi (phosphate) sont quelquefois utilisées en biologie pour désigner les dérivés "inorganiques" du phosphore qui sont libérés à l'occasion de réactions biologiques du type sus-indiqué.

Ce type de réaction est certes déjà utilisé dans des dosages de substances biologiques du type sus-indiqué, mais les moyens de révélation connus deviennent inopérants, lorsque ces substances biologiques ne sont présentes qu'en quantités infimes dans les échantillons étudiés.

L'invention a pour but de fournir des réactifs suffisamment sensibles et permettant précisément l'utilisation de cette réaction pour doser de telles substances biologiques, même lorsqu'elles n'existent dans les échantillons biologiques étudiés qu'en quantités infimes, notamment du nanogramme ou même beaucoup moins.

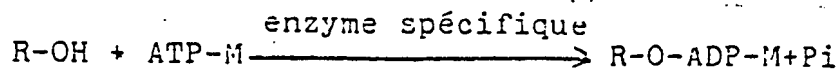
Le réactif selon l'invention consiste dans un produit de modification de l'ATP, ce produit étant caractérisé par la fixation de façon covalente sur cet ATP d'une molécule chimique portant au moins un groupe non engagé dans la liaison covalente susdite et couplable directement ou indirectement avec une molécule ou un produit ayant une affinité spécifique pour ce groupe et permettant par conséquent la reconnaissance sélective des substances biologiques susdites.

En particulier ce groupe permet une liaison affine chimique ou immunologique avec une molécule ou un produit lui-même directement révélabile ou susceptible d'être révélateur. En outre ce groupe est tel qu'il ne modifie pas la capacité de l'enzyme choisie d'assurer l'incorporation du dérivé modifié d'AMP ou d'ADP portant les mêmes groupes de modification que l'ATP modifié initial, dans ou sur la substance à doser, et ce dans les conditions normales d'incorporation de l'AMP ou de l'ADP non modifié sur la même substance en présence de la même enzyme.

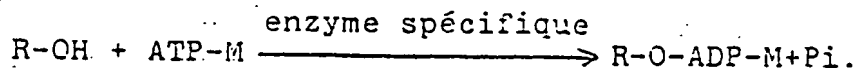
L'invention concerne également un procédé de détection ou dosage d'une substance appartenant à la catégorie de substances ci-dessus définie consistant à faire réagir la composition présumée contenir une telle substance avec l'ATP modifié selon l'invention, en présence de l'enzyme spécifique correspondante, dans des conditions permettant l'incorporation d'un AMP ou d'un ADP modifié correspondant, dans ou sur ladite substance et, le cas échéant, après élimination de l'excès d'ATP modifié libre, à placer la composition obtenue dans des conditions permettant l'éventuel couplage des groupes de modification portés par l'AMP modifié ou l'ADP modifié incorporé à ladite substance, avec la molécule ou le produit

permettant la reconnaissance du groupe de modification du dérivé initial d'ATP et à détecter ou à doser la susdite substance éventuellement présente portant lesdits produits de reconnaissance.

5 Dans le cas d'aminoglycoside, le dosage mettra par conséquent en oeuvre une réaction qui peut être schématisée par l'équation suivante :



10 ou encore pour d'autres substances comme les oses-1-phosphate :



15 Le dosage du composé R-O-AMP-M (ou du composé R-O-ADP-M), après élimination de l'éventuel excès d'ATP-M, est d'une sensibilité considérable. Dans le cas des antibiotiques, cette méthode permet de doser des quantités d'un nanogramme d'antibiotique.

20 Parmi les substances susceptibles d'être dosées par une telle méthode, on citera, outre les antibiotiques du type aminoglycosides, et à titre d'exemples, les oses-1-phosphate comme le galactose-1-phosphate (étude de la galactosémie) et le glucose 1-phosphate, l'acide N-acétylneuraminique, l'acide 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphorique ...

25 L'enzyme spécifique intervenant dans cette transformation sera en général constituée par une adényltransférase, une acylneuraminate citidyltransférase, une glucose 1-phosphate uridyltransférase, l'ATP phosphoribosyltransférase

30 Le groupe chimique lié de façon covalente à l'ATP peut revêtir les formes les plus diverses, dès lors qu'il possède un groupe permettant son couplage avec des substances affines permettant sa révélation, de préférence sous forme directement visualisable, 35 et qu'il n'empêche pas l'enzyme susdite de catalyser l'incorporation du dérivé d'AMP ou d'ADP correspondant sur la substance sus-visée.

Parmi les groupes chimiques préférés suscep-

4.

tibles d'être fixés sur les bases des susdits ribonucléotides, on mentionnera tout groupe susceptible d'être reconnu spécifiquement par une autre molécule ou par un produit, lui-même aisément détectable, de préférence par une méthode de visualisation.

5

Cette autre molécule ou cet autre produit consiste par exemple en une enzyme, dont la présence peut être révélée par l'action qu'elle est susceptible d'exercer sur un substrat, de préférence un substrat

donnant lieu à des réactions de coloration ou de décoloration, ou plus généralement encore de modification de spectres d'absorption respectivement décelables par colorimétrie ou spectrophotométrie. On peut naturellement
5 avoir recours à des molécules ou produits donnant lieu à des réactions de fluorescence, à des modifications de densité optique, etc., par exemple des produits comprenant des groupes dérivés de l'aminofluorène, du chlorure de dansyle, de la rhodamine, etc..

10 Parmi les groupes de modification appropriés, on mentionnera les groupes chimiques dont est connue l'affinité pour un autre type de molécule chimique. Parmi ces groupes de modification chimique, on peut mentionner la biotine ou l'avidine, dont on connaît les affinités réci-
15 proques, les groupes dérivés de l'une de ces molécules pouvant servir à la modification du ribonucléotide choisi et l'autre de molécule couplable avec un réactif marqué par une enzyme ou susceptible d'être fixée à une enzyme, par exemple dans les conditions décrites dans le brevet
20 n° 78 10975 de l'INSTITUT PASTEUR déposé le 13 avril 1978. Ce réactif consiste par exemple en un anticorps spécifique dirigé contre le groupe de modification ou en une molécule ayant une affinité spécifique pour ledit groupe de modification.

25 Parmi les groupes de modification utiles du ribonucléotide initial, figurent également des antigènes ou haptènes susceptibles d'être reconnus par des anticorps préalablement formés contre ces antigènes ou contre ces haptènes, plus particulièrement lorsque ceux-ci ont été
30 fixés au préalable sur une macromolécule support, telle qu'un sérum-albumine ou un polypeptide, par exemple une polylysine. Parmi ces antigènes ou haptènes, on peut citer la biotine et l'avidine elles-mêmes, des groupes acétylaminofluorène, des peptides, hormones ou prostaglandines,
35 notamment ceux auxquels correspondent des antisérums ou anticorps spécifiques, des lectines, dont est connue la capacité à être couplées à des enzymes permettant leur révélation, notamment des peroxydases, β -galactosidases, etc... De tels sérums ou anticorps sont disponibles dans

BUREAU

le commerce.

Mais la molécule ou le produit présentant des caractéristiques d'affinité vis-à-vis du groupe de modification susdit, sert éventuellement aussi seulement de relais vis-à-vis d'une autre molécule ou d'un autre produit susceptible d'être visualisé à son tour, notamment dans les conditions sus-indiquées ; par exemple le produit présentant les caractéristiques d'affinité, vis-à-vis du groupe de modification susdit, est constitué par un anticorps lui-même non marqué, mais reconnaissable à son tour par des anticorps contre lui-même, ces derniers anticorps étant eux-mêmes couplés à l'enzyme susceptible d'agir sur un substrat spécifique, dans les conditions classiques en matière de dosage immunoenzymatique.

D'une façon générale, le groupe de modification du ribonucléotide est constitué par toute molécule ou produit chimique fixable sur l'ATP et ensuite détectable dans les conditions qui ont été indiquées, dans la mesure où il répond aux conditions sus-indiquées. L'invention comprend également un test de reconnaissance des groupes compatibles. Ces groupes sont ceux qui n'empêchent pas la fixation de l'AMP modifié correspondant sur des aminoglycosides, notamment la tobramycine en présence d'adénylyl-transférase dans les conditions sus-indiquées, cet AMP modifié devant naturellement être fourni par l'ATP préalablement modifié par le groupe de modification étudié.

Le groupe de modification chimique sus-indiqué est fixé sur la position 6, de préférence 8, du groupe adénine.

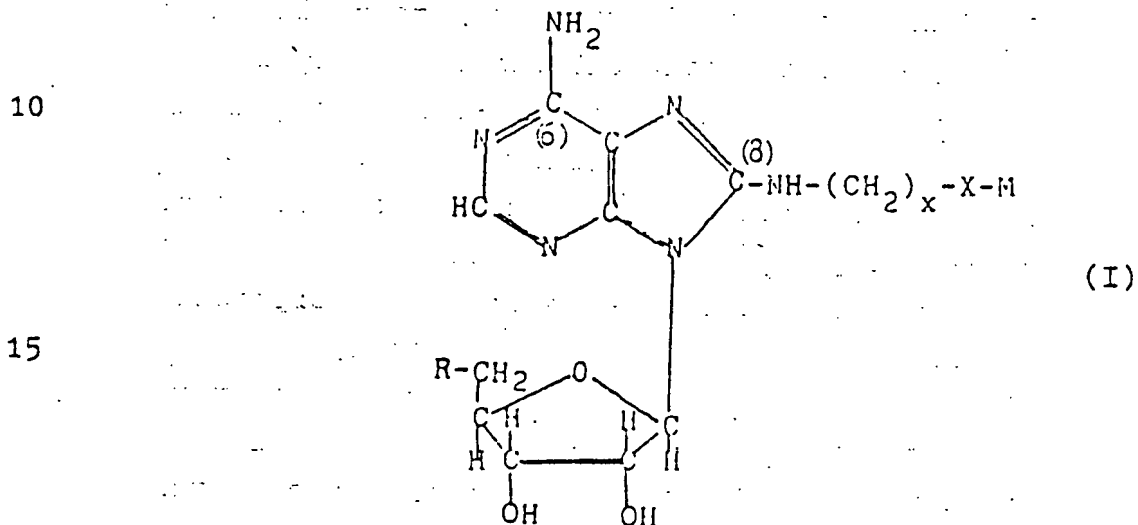
Cette fixation intervient avantageusement par l'intermédiaire d'un bras du type $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_x\text{-X}$, ou $\text{-CO-(CH}_2\text{)}_x\text{-X}$, dans lequel x varie de 2 à 20, notamment de 6 à 12, et X est un groupe assurant la liaison entre un groupe M, choisi parmi ceux qui sont susceptibles d'une réaction de liaison avec un agent chimique ou immunologique ayant une affinité sélective pour ce groupe. Les groupes CH_2 du bras susdit peuvent en partie être remplacés par des groupes CO ou NH, à condi-

BUL
C
V

tion naturellement que ces groupes de remplacement ne soient pas adjacents à des groupes identiques.

Par exemple, si l'on considère le cas de la modification du groupe adénine de l'ATP en sa position 8, le ribonucléotide modifié obtenu peut être représenté par la formule (cas d'un bras du type

-NH-(CH₂)_x-X-) :



20 dans laquelle R est un groupe triphosphate, x, X et M ont les significations sus-indiquées. Avantagusement, le groupe X est constitué par un groupe NH ou CO.

Un procédé pour fabriquer le dérivé de formule I, par exemple à partir de l'ATP préalablement bromé en position 8, consiste à le faire réagir dans les

25 conditions appropriées, avec un composé de formule H₂N-(CH₂)_x-X-Y, dans lequel Y représente un radical auquel sera ensuite substitué le groupe M susdit, notamment par la mise en oeuvre d'une réaction de condensation avec une molécule MZ, au cours de laquelle est

30 alors formé le produit de condensation de formule I, avec libération d'une molécule Y-Z.

Lorsque le groupe X est NH, Y est avantagusement de l'hydrogène. Lorsque X est CO, Y est avantagusement un hydroxyle. Z peut être constitué par tout

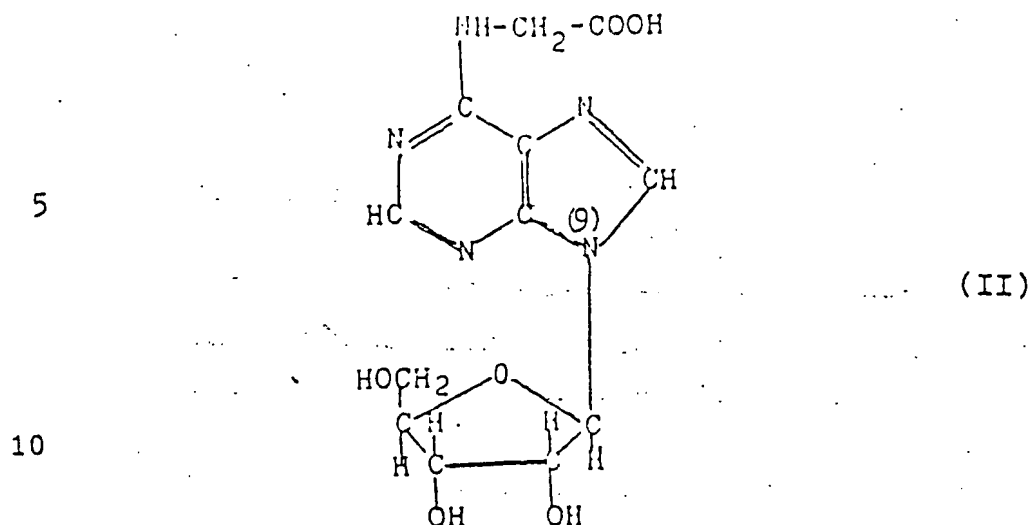
35 groupe susceptible d'être détaché de M dans la susdite réaction de condensation, par exemple le fluor lorsque la molécule chimique donneuse du groupe recherché est le

fluoro -1-dinitro-2,4 benzène, ou un hydroxyle

ou de l'hydrogène dans le cas d'un peptide. Dans ce dernier cas, la fixation de ce peptide à l'extrémité du bras susdit peut, lorsque le groupe XY est constitué par un groupe NH_2 ou COOH , être effectué par la mise en oeuvre de réactions de couplage, traditionnelles dans la chimie des protéines, entre groupes carboxyle et amine, respectivement portés par les deux éléments peptidiques distincts à coupler, par exemple par condensation en présence d'un agent de condensation, tel que le dicyclohexyl-carbodiimide ou après formation préalable d'un ester activé à la fonction carboxylique de celui de ces deux éléments peptidiques qui le portent.

La position 8 sur le cycle adénine de l'ATP ne constitue évidemment pas le seul point sur lequel peut se brancher une chaîne porteuse d'un groupe de modification tel qu'il a été défini plus haut. A titre d'exemple, on peut également substituer l'un des atomes d'hydrogène porté par le carbone en position 6 du cycle adénine par une chaîne porteuse de ce groupe. A titre d'exemple, on mentionnera la possibilité de substitution qui consiste à faire réagir avec l'ATP de l'acide iodoacétique ou un acide organique iodé équivalent, permettant la formation préalable d'un sel quaternaire, faisant intervenir l'azote en position 1, sel qui se transforme ensuite par chauffage en milieu basique à 35°C , à pH légèrement basique, notamment à pH 8, pendant le temps suffisant, par exemple 72 heures, en un produit de substitution de l'un des hydrogènes du groupe NH_2 fixé sur le carbone en position 6 du groupe adénine (réaction du type connu sous l'expression "réarrangement de Dimroth").

On obtient alors (lorsque l'acide organique iodé est constitué par l'acide iodoacétique) le composé de formule II ci-après :



15 Ce composé peut ensuite être transformé, par réaction avec le composé de formule $H_2N-(CH_2)_x-X-Y$ déjà défini plus haut, dans des conditions permettant la liaison chimique entre le groupe carbonyle initialement contenu dans le groupe carboxyle dans le composé de

20 formule II et le groupe imino appartenant initialement à la fonction aminée du composé $H_2N-(CH_2)_x-X-Y$, lequel peut alors être couplé à son tour avec un composé de formule MZ, dans les conditions qui ont déjà été définies plus haut.

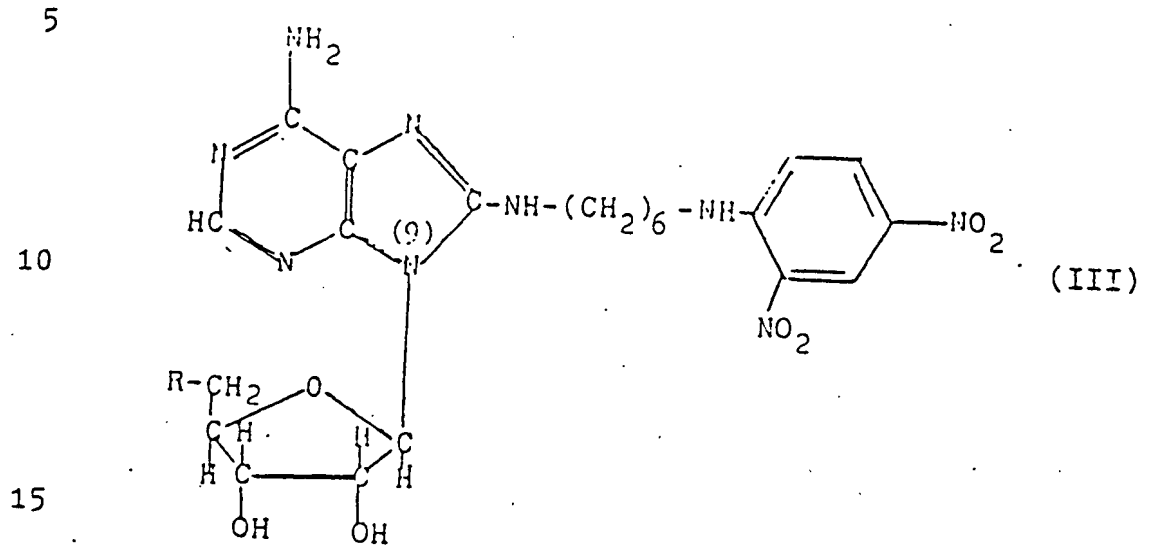
25 Il va de soi que tous les éléments qui précèdent ne visent qu'à illustrer des modes de préparation particuliers qui permettent de fixer sur l'ATP un groupe de modification choisi parmi ceux auxquels correspondent des molécules affines, comme cela a été défini plus haut.

30 D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description d'exemples de mises en oeuvre préférées de l'invention.

Préparation du 8-[N-(dinitro-phényl)-amino-hexyl]-aminoadénosine 5'-triphosphate.

35 On fait réagit du 8-(aminohexyl)-aminoadénosine 5'-triphosphate avec du fluoro-1-dinitro-2,4-benzène,

10
 d'un mélange eau-éthanol 10/1 volumes %, à
 pH 8,8, à 40°C, et en présence d'un sel, notamment
 chlorure de magnésium. Le produit de réaction finale-
 ment obtenu a pour formule :

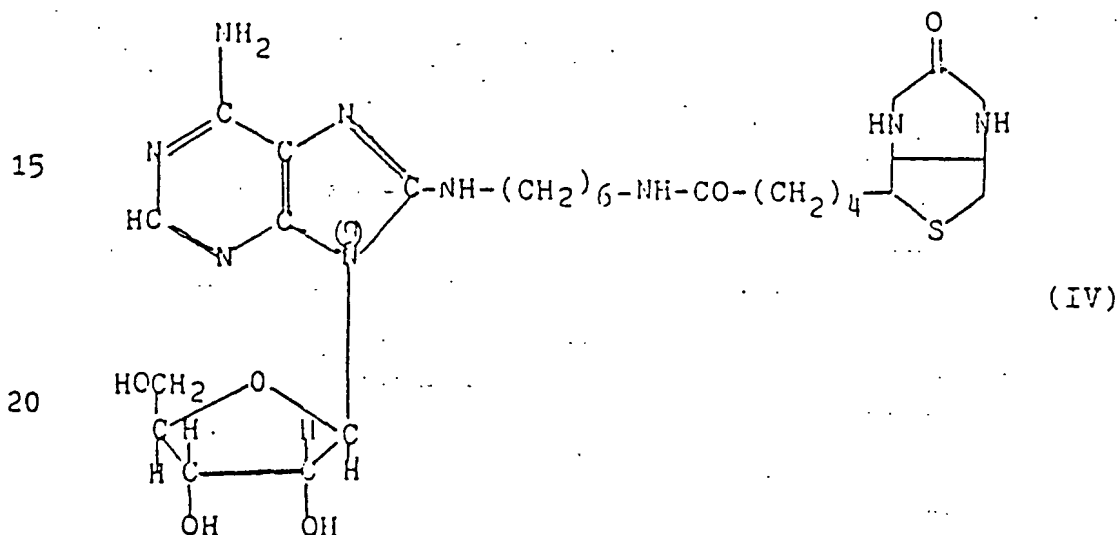


On récupère le dérivé de formule III, ci-
 après dénommé ATP-DNP, après une purification comprenant
 la fixation du ribonucléotide sur DEAE cellulose, élu-
 tion avec un gradient de LiCl 0,2 N, pH 5,5, à LiCl
 0,5 N, pH 2 et filtration sur tamis moléculaire du
 type SEPHADEX G50. Le rendement réactionnel est de
 52 %. Les fractions recueillies sont analysées par spec-
 trophotométrie d'absorption de rayonnements de lon-
 gueurs d'onde de 280 et 360 nanomètres respectivement.
 On recueille celle des fractions dont les densités op-
 tiques dans les deux susdits domaines de longueurs
 d'onde sont dans un rapport (DO_{280}/DO_{360}) égal à 4. Le
 produit contenu dans cette fraction correspond à celui
 résultant de la fixation de 1 mole de DNP sur 1 mole
 d'ATP. Il ne donne également qu'une tache dans un sys-
 tème de chromatographie en couche mince. Le produit de
 cette fraction est lyophilisé.
 Ce produit présente la caractéristique d'être
 reconnu par des anticorps formés au préalable à l'égard
 de dinitro-2,4 benzène, qui avait préalablement été
 fixé sur un support macromoléculaire du type de la

sérum-albumine. Des anticorps de ce type sont par ailleurs disponibles dans le commerce.

Préparation du 3-(N-biotinyl-aminohexyl)aminoadénosine 5'-triphosphate.

- 5 On condense du 8-(aminohexyl)-amino-adénosine-5'-triphosphate avec le biotinyl-N-hydroxysuccinimide-ester, dans les conditions décrites par LANCER et al, telles qu'appliquées à la fabrication du biotinyl-UTP à partir de la 5-(3-amino)allyluridine. On obtient
10 alors le composé de formule :



Dosage de tobramycine.

- 25 L'échantillon présumé contenir le susdit antibiotique est constitué par du sérum provenant d'un patient traité par un aminoglycoside. Ce sérum est préalablement déprotéinisé.

Cet échantillon est mis en solution dans une solution tamponnée dont la composition est la suivante :

Tris HCl 50 mM, pH 7,5

MgCl₂ 10 mM,

DTT 1 mM.

- On ajoute à la solution ainsi formée 10 micromoles
35 d'ATP-DNP et on laisse incuber pendant 1 heure à 37° C avec 10 U d'adénylyltransférase extraite de *Staphylococcus*

rivet ou de *Escherichia coli* R55.

Une partie du produit de réaction est alors prélevée, notamment par une pipette d'EPPENDORF (GILSON) comprenant dans sa partie inférieure un échangeur de cations capable de fixer l'antibiotique modifié par
5 l'AMP-DNP, les autres constituants, y compris l'excès d'ATP-DNP et les phosphates organiques formés restant alors dans la solution.

L'échangeur de cations (Amberlite CG 50, 200-400 mesh, forme NH_4^+) est alors lavé avec la susdite
10 solution tampon. L'antibiotique modifié est ensuite élué à partir de l'échangeur de cations, à l'aide d'une solution d'ammoniaque 1N. Le soluté obtenu est ensuite neutralisé avec HCl 1N.

Le dosage comprend alors finalement l'étape
15 consistant à mettre en contact la susdite solution avec un anticorps anti-DNP couplé à de la peroxydase, à recueillir l'éventuel complexe formé entre, d'une part, l'aminoglycoside dans lequel est incorporé le produit de dégradation de l'ATP-DNP, et, d'autre part,
20 le susdit anticorps et à le mettre en contact avec un substrat colorable de la peroxydase. La présence d'antibiotique est alors manifestée par la coloration du substrat de la peroxydase, coloration qui permet même de fournir des indications quantitatives concernant la
25 quantité d'antibiotique que contenait initialement l'échantillon traité.

Dans l'exemple considéré le substrat est avantageusement constitué par une solution contenant :
30 - de l'eau oxygénée : 10 μl d' H_2O_2 à 110 volumes,
- de l'acétate de potassium : 9,5 ml 0,05M, pH 5,1,
- du 3-amino-9-éthylcarbazole : 2 mg dissous dans 0,5 ml de N-N'-diméthylformamide.

On peut par cette méthode doser des quantités de l'ordre du nanogramme par millilitre du susdit
35 aminoglycoside.

L'invention ne se limite évidemment pas aux modes de réalisation décrits ci-dessus à titre

d'exemples et l'homme de l'art peut y apporter des modifications sans pour autant sortir du cadre des revendications ci-après.

REVENDICATIONS

1 - ATP modifié résultant de la fixation covalente sur la position 6, ou de préférence 8, du groupe adénine de l'ATP, d'un groupe M, choisi parmi ceux qui sont susceptibles d'une réaction de liaison avec un agent chimique ou immunologique ayant une affinité sélective pour ce groupe, par l'intermédiaire d'un bras du type $-NH-(CH_2)_x-X$, ou $-CO-(CH_2)_x-X$, dans lequel X est un groupe assurant la liaison avec le susdit groupe M et x varie de 2 à 20, notamment de 6 à 12, à condition que x soit distinct de 2 lorsque M est un groupe dinitro-2,4-phényle.

2 - ATP modifié selon la revendication 1, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification est susceptible d'être reconnu spécifiquement et directement par une autre molécule ou par un produit, lui-même aisément détectable, par une méthode de visualisation.

3 - ATP modifié selon la revendication 2, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification est constitué par un antigène ou un haptène susceptible d'être reconnu par un anticorps préalablement formé contre cet antigène ou contre cet haptène.

4 - ATP modifié selon la revendication 1, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification sert de relais vis-à-vis d'une autre molécule ou d'un autre produit susceptible d'être visualisé à son tour.

5 - ATP modifié selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification ou, selon le cas, la susdite molécule relais, est couplable chimiquement avec une molécule affine marquée par une enzyme ou immunologiquement avec un anticorps marqué par une enzyme et ayant une affinité sélective pour ledit groupe de modification ou la susdite molécule relais.

6 - ATP modifié selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les groupes CH_2 du

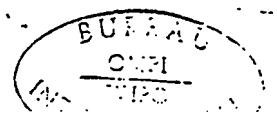
15

bras susdit peuvent en partie être remplacés par des groupes CO ou NH, à condition que ces groupes de remplacement ne soient pas adjacents à des groupes identiques.

7 - ATP modifié selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification comprend un groupe dérivé de la biotine, de l'avidine ou un groupe dinitro-2,4-phényle.

8 - Procédé de détection ou de dosage d'une substance appartenant à la catégorie de substances biologiques, telles que certains antibiotiques plus particulièrement ceux de la classe des aminoglycosides, qui sont capables, en présence d'enzymes spécifiques, d'incorporer de l'ADP ou de l'AMP, ces dernières molécules étant susceptibles d'être fournies à ces substances biologiques à partir d'ATP en présence d'une enzyme spécifique appropriée, caractérisé par les étapes qui consistent :

- à mettre la composition présumée contenir la substance recherchée avec un réactif contenant un ATP modifié par une molécule chimique fixée de façon covalente au cycle adénine de cet ATP et portant au moins un groupe non engagé dans la liaison covalente susdite et couplable directement ou indirectement avec une molécule ou un produit ayant une affinité spécifique pour ce groupe et permettant sa reconnaissance, ledit groupe étant en outre tel qu'il n'empêche pas l'ATP modifié qui le porte à fournir l'AMP modifié ou l'ADP modifié correspondant dans une forme incorporable dans ladite substance recherchée,
- à placer, le cas échéant, après élimination des ATP modifiés libres, la composition obtenue dans des conditions permettant l'éventuel couplage des groupes de modification portés par l'AMP modifié ou l'ADP modifié incorporé à ladite substance, avec la molécule ou le produit permettant la reconnaissance du groupe de modification du dérivé initial d'ATP, et



- à détecter ou à doser la susdite substance éventuellement présente portant lesdits produits de reconnaissance.

9 - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le réactif utilisé contient un ATP modifié
5 résultant de la fixation covalente sur la position 6, ou de préférence 8, du groupe adénine de l'ATP d'un groupe M, choisi parmi ceux qui sont susceptibles d'une réaction de liaison avec un agent chimique ou immunologique ayant une affinité sélective pour ce groupe, par l'intermédiaire
10 d'un bras du type $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_x\text{-X}$, ou $\text{-CO-(CH}_2\text{)}_x\text{-X}$, dans lequel X est un groupe assurant la liaison avec le susdit groupe M et x varie de 2 à 20, notamment de 6 à 12.

10 - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le réactif utilisé contient un ATP modifié
15 conformément à l'une quelconque des revendications 1 à 7.

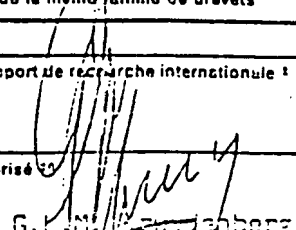
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/FR 82/00222

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ¹ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. ³ : C 07 H 19/20; G 01 N 53/50; C 12 Q 1/00		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁴		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. ³	C 07 H 19/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁶		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴		
Category ⁸	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
X, Y	DE, A, 2618511 (MILES) 04 November 1976, see pages 34-119	1-9
X, Y	DE, A, 2618419 (MILES) 04 November 1976, see pages 34-62	1-9
Y	US, A, 4255566 (R.J.CARRICO et al.) 10 March 1981, see column 2, lines 50-70; columns 3, 4	1-7
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>* Special categories of cited documents: ¹⁵</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search ¹ 16 March 1983 (16.03.83)		Date of Mailing of this International Search Report ¹ 31 March 1983 (31.03.83)
International Searching Authority ¹ European Patent Office		Signature of Authorized Officer ²⁰

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 82/00222

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) * Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB.³ : C 07 H 19/20; G 01 N 53/50; C 12 Q 1/00		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée *		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB.³ :	C 07 H 19/00	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté *		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS 14		
Catégorie *	Identification des documents cités, 16 avec indication, si nécessaire, des passages pertinents 17	N° des revendications visées 18
X, Y	DE, A, 2618511 (MILES) 4 novembre 1976 voir pages 34-119 ---	1-9
X, Y	DE, A, 2618419 (MILES) 4 novembre 1976 voir pages 34-62 ---	1-9
Y	US, A, 4255566 (R.J. CARRICO et al.) 10 mars 1981 voir colonne 2, lignes 50-70; colonnes 3, 4 -----	1-7
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités: 16</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée : <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">16 mars 1983</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale : <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">31 MARS 1983</div>
Administration chargée de la recherche internationale : <div style="text-align: center; font-weight: bold;">OFFICE EUROPEEN DES BREVETS</div>		Signature du fonctionnaire autorisé : <div style="text-align: right;">  G. M. J. Janssens </div>